运用 α-氰代酯荧光底物检测抗性棉蚜羧酸酯酶代谢活性

曹传旺[1,2], 史雪岩[2], 姜 辉[3], 梁 沛[2], 高希武[2,*]

(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 中国农业大学昆虫学系, 北京 100094; 3. 农业部农药检定所, 北京 100024)

摘要: 为了研究抗性和敏感棉蚜 *Aphis gossypii* 品系对菊酯类药剂代谢的差异, 本实验合成了溴氰菊酯和高效氯氰菊酯报告荧光底物, 应用这两种底物水解后生成具有荧光化合物的特性,测定了不同品系棉蚜羧酸酯酶的代谢活性。结果表明: 氧化乐果棉蚜抗性和敏感品系羧酸酯酶对溴氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为 10.0 和3.4 pmol/min · mg; 对高效氯氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为 4.0 和 2.4 pmol/min · mg, 抗性品系羧酸酯酶对溴氰菊酯和高效氯氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为敏感品系的 2.9 和 1.7 倍; 溴氰菊酯棉蚜抗性和敏感品系羧酸酯酶对溴氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为 7.6 和 6.2 pmol/min · mg; 对高效氯氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为 9.3 和 5.2 pmol/min · mg, 抗性品系羧酸酯酶对溴氰菊酯和高效氯氰菊酯报告荧光底物的代谢活性分别为敏感品系的 1.2和 1.8 倍。这种衍生的报告荧光底物能够用来检测抗性棉蚜羧酸酯酶的水解活性, 表明羧酸酯酶可能参与棉蚜对溴氰菊酯和氧化乐果抗性的形成。

关键词: 棉蚜; 抗性; 羧酸酯酶; 代谢活性; 荧光底物

中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)03-0261-06

Application of α-cyanoesters as fluorescent substrates for examining metabolic activity of carboxylesterases in cotton aphid, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) resistant to pesticides

CAO Chuan-Wang[1,2], SHI Xue-Yan[2], JIANG Hui[3], LIANG Pei[2], GAO Xi-Wu[2,*] (1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100024, China)

Abstract: In order to clarify the difference of pyrethroid metabolosim between resistant and susceptible strains, deltamethrin and cypermethrin reporter fluorescent substrates with fluorescent characteristics after hydrolysis were synthesized and used to assay carboxylesterase metabolic activities in different strains of cotton aphid, *Aphis gossypii*. The results showed that the specific carboxylesterase activities to deltamethrin reporter fluorescent substrate were 10.0 and 3.4 pmol/min · mg in the omethoate-selected resistant and susceptible strains of cotton aphid, respectively, while those to cypermethrin reporter fluorescent substrate were 4.0 and 2.4 pmol/min · mg, respectively. The carboxylesterase activity in the omethoate-selected resistant strain was 2.94- and 1.67- fold compared with that in the susceptible strain when using deltamethrin and cypermethrin reporter fluorescent substrates, respectively. However, the specific carboxylesterase activities to deltamethrin reporter fluorescent substrate were 7.6 and 6.2 pmol/min · mg in the deltamethrin-selected resistant and susceptible strains of cotton aphid, respectively, while those to cypermethrin reporter fluorescent substrate were 9.3 and 5.2 pmol/min · mg, respectively. The

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2006CB102003); 国家自然科学基金项目(30571232, 30530530); 新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0113)

作者简介: 曹传旺, 男, 1977 年 12 月生, 安徽太湖人, 博士, 讲师, 主要从事昆虫毒理学、环境毒理学及昆虫生态学研究, E-mail: chuanwangcao@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2008-10-15; 接受日期 Accepted: 2009-02-15

carboxylesterase activity in the deltamethrin-selected resistant strain was 1.23- and 1.79-fold compared with that in the susceptible strain when using deltamethrin and cypermethrin reporter fluorescent substrates, respectively. The surrogates for pyrethroids can be used to monitor carboxylesterase hdyrolytic activity of resistant cotton aphids, suggesting that carboxylesterases may be involved in deltamethrin and omethoate resistance in cotton aphids.

Key words: *Aphis gossypii*; resistance; carboxylesterase; metabolic activity; fluorescent substrate

有色光吸收和荧光分子物质在化学、分子生物学和药物科学中起着重要的作用，它具有灵敏度高和选择性好的特点。许多研究者运用这种探针去监测复杂环境和生物样品（包括组织和细胞）中的特殊化合物[例如：羧酸酯酶（EC 3.1.1.1）同工酶能水解酯、硫脂和粉溶素]。酯酶在代谢昆虫、哺乳类和其他动物的内源和外源性化合物中起着重要的作用。选择敏感和特殊的底物对于酶特性、组织化学、毒物和生理学研究是非常重要的。普通酯酶底物有的缺乏敏感性[如：对硝基苯乙酸酯（p-NPA）]在测试体系中稳定性差，导致出现高的背景信号，像羧基荧光素双乙酸酯（一种荧光底物）（Gutfreund and Sturtevant, 1956）。酯酶同工酶的多样性也导致运用普通底物不能检测一些特殊同工酶活性。为了克服这些普通底物的缺陷，Shan 和 Hammock（2001）描述了一种通过合成能够水解后产生荧光的衍生底物来模拟菊酯类农药的方法。

菊酯类农药是一种重要的杀虫剂，占世界杀虫剂市场的 25% 以上（Hougard *et al.*, 2002）。在哺乳动物和昆虫中，酯酶通过断裂菊酯酯键形成酸和醇（Casida, 1983; Funaki *et al.*, 1994; Shan and Ottea, 1998）。α-氰基菊酯水解产生一种酸和一种氰醇，氰醇在水溶液中自发生成间苯氧基苯甲醛（Shono *et al.*, 1979）。这种醛分子有延伸的 π 键能吸收比母体化合物和 α-氰基苯氧乙醇更强的光，这样就提供了一种灵敏而又特殊的测定菊酯酯酶的方法（Shan and Hammock, 2001）。在这种原理的基础上，含有一个 α-氰基的酯酶底物能够被设计成有少许或没有荧光但能够通过酯水解后转化成一种具有强荧光的醛。本文根据以上思路合成了一种类似于高效氯氰菊酯和溴氰菊酯的报告荧光底物，运用棉蚜不同品系羧酸酯酶粗酶液代谢生成带有荧光基团底物，在荧光分光光度计上测定羧酸酯酶代谢活性，从而分析不同品系棉蚜羧酸酯酶对菊酯类杀虫剂的代谢能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂：高效氯氰菊酯（95.2%）和溴氰菊酯（99%）来源于扬州化学公司。6-甲氧基-2-萘甲醛（6-methoxy-2-naphthaldehyde）、碘化锌（zinc iodide）、三甲硅烷基氰化物（trimethylsilyl cyanide, TMSCN）购自 Sigma 公司。其他合成所用试剂均购自 Sigma 公司。

1.1.2 供试昆虫：棉蚜氧化乐果敏感品系（YSS）和溴氰菊酯敏感品系（DSS）由新疆石河子大学张东海先生提供。氧化乐果抗性品系（YRR）和溴氰菊酯抗性品系（DRR）均由室内选育得到。氧化乐果抗性倍数为 21.72 倍（Cao *et al.*, 2008a），溴氰菊酯抗性倍数为 228.59 倍（Cao *et al.*, 2008b）。

1.2 羧酸酯酶粗酶制取

挑取不同棉蚜品系无翅健壮成蚜各 300 头，加入 1 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）匀浆，4℃，10 800 rpm 离心 15 min，上清液作为酶液母液，将其分装置于 -20℃，根据实验需求稀释不同的倍数。

羧酸酯酶蛋白含量测定参考 Bradford（1976）的方法。取 0.5 mL 稀释的酶液，加入 2.5 mL 考马斯亮蓝，加入 0.5 mL 磷酸缓冲液（pH 7.0, 0.04 mol/L）作为空白对照，在紫外分光光度计下测定 595 nm 波长下的吸光值，重复 3 次，根据 BSA 蛋白标准曲线计算羧酸酯酶蛋白含量值。

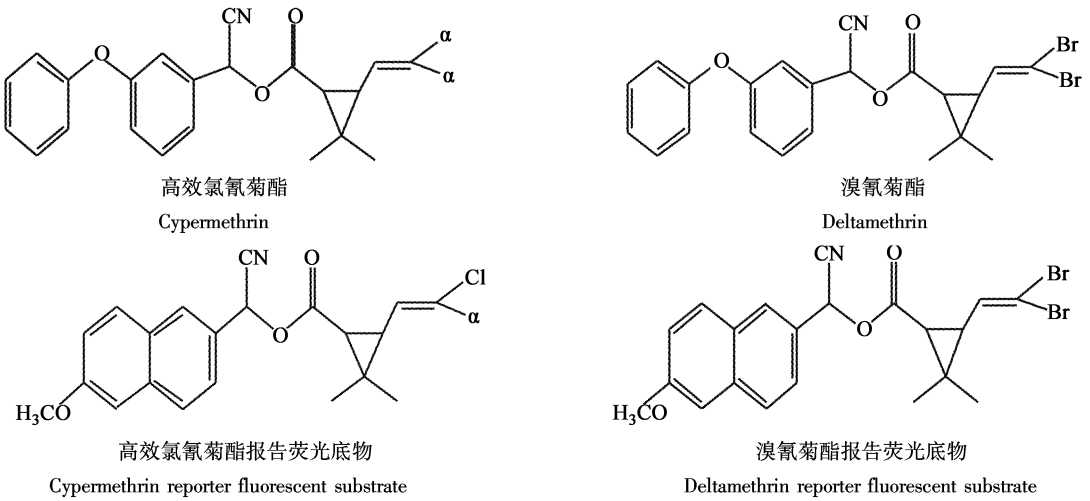
1.3 菊酯报告荧光底物合成

R/S 羟基-6-甲氧基萘-2-基-氰基甲烷[（R/S）-hydroxy-（6-methoxynaphthalen-2-yl）-acetonitrile][本文中命名为氰醇（cyanohydrin）]参照 Gassman 和 Tally（1978）方法合成。

氮气保护下，将 50 mg 碘化锌加入到冰浴冷却的 4.5 mL 6-甲氧基-2-萘甲醛（1.86 g, 10 mmol）的 $CHCl_3$ 溶液中。然后在室温下加入

0.8 mL TMSCN，将溶液慢慢冷却到 30℃，反应几分钟后再加入 0.8 mL TMSCN。将反应混合物温度升至 40℃保持 10 min 后，室温搅拌 1.5 h。在通风橱中，将反应混合物与 15 mL 含 3.5 mL 3mol/L HCl 的乙二醇二甲醚（ethylene glycol dimethyl ether）搅拌混合，混合物在室温下搅拌 30 min后，用水稀释，并用 $CHCl_3$ 提取 2 次，用水洗有机相后，用无水 Na_2SO_4 干燥。脱去溶剂能够得到 1.70 g（85%）的氰醇。薄层层析（TLC）R_f 值为 0.66[正己烷∶乙酸乙酯 =4∶1(v/v)]。

(±)反/顺-3-(2,2 二氯(溴)乙烯基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸氰基-(6-甲氧基萘-2-基)-甲酯合成：将 0.75 g(3.59 mmol)(±)反/顺-3-(2,2-二氯(溴)乙烯)-2,2-二甲基环丙烷羧酸溶于含有 1 μL 二甲基甲酰胺(DMF)的 1 mL 氯仿中，加入0.52 mL 亚硫酰氯(7.12 mmol)，氮气保护下，油浴 65℃反应2 h。将反应混合物脱去溶剂后，加入 2 mL 正己烷，再脱去溶剂。将残留物溶解在 3 mL 氯仿中，快速加入到冰浴冷却的溶于 3 mL 氯仿和 0.348 mL 嘧啶的羟基-(6-甲氧基萘-2-基)-氰化甲烷(0.64 g，3 mmol)中，室温放置3 h。将反应混合物依次用水、1 mol/L HCl、饱和 $NaHCO_3$ 溶液和水冲洗，用 Na_2SO_4 干燥。脱去溶剂得到浅黄色的油状物。硅胶柱色谱纯化[15%(v/v)的乙酸乙酯∶正己烷]得到 0.62 g(51%)的合成底物。薄层层析(TLC)R_f 值为 0.82[正己烷∶乙酸乙酯 =4∶1(v/v)]。高效氯氰菊酯和溴氰菊酯及其合成荧光报告底物如图 1 所示。



高效氯氰菊酯
Cypermethrin

溴氰菊酯
Deltamethrin

高效氯氰菊酯报告荧光底物
Cypermethrin reporter fluorescent substrate

溴氰菊酯报告荧光底物
Deltamethrin reporter fluorescent substrate

图 1 高效氯氰菊酯和溴氰菊酯及其合成底物化学结构

Fig. 1　Structure of cypermethrin and deltamethrin and their reporter substrates

1.4 羧酸酯酶代谢活力测定

测试不同棉蚜品系羧酸酯酶代谢溴氰菊酯报告荧光底物和高效氯氰菊酯报告荧光底物。在 1 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中加入 1 μL 底物(10 mmol/L，溶于乙醇)，然后加入 1 μL 酶液，混匀，30℃温育 30 min，在荧光分光光度计上，用激发光波长为 330 nm，发射光波长为 460 nm 监测 1 min，记录 460 nm 左右波长下荧光密度。用煮死的酶液作为空白对照，实验重复 3 次。根据测得的荧光密度、标准曲线和蛋白含量按照如下公式计算羧酸酯酶代谢活性。

酶代谢活性(pmol/min · mg) = $(C \times V_{总})/(T \times Pr \times V_E)$。

其中，C(pmol/L)：根据产物荧光密度(RFU)及标准产物标准曲线计算出的代谢底物浓度；$V_{总}$(mL)：反应总体积；T(min)：反应时间；Pr(mg/mL)：酶蛋白含量；V_E(mL)：酶体积。

1.5 数据统计分析

采用 EXCEL 和 Graph Pad InStat 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线制作

将 1 μL 棉蚜不同品系羧酸酯酶测试酶液和 1 μL不同体积 10 μmol/L 标准底物加入到 1 mL Tris-HCl (pH 8.0，20 mmol/L)缓冲液中反应，在荧光分光光度计上，用激发波长 330 nm，发射波

长 460 nm 监测 1 min，记录 460 nm 波长下荧光密度。根据荧光密度(RFU)和标准底物浓度(nmol/L)制作标准曲线。标准荧光底物 6-甲氧基-2-萘甲醛在氧化乐果抗性品系羧酸酯酶粗酶液中的标准曲线如图 2 所示，9 个浓度的标准底物均在 460 nm 左右处有一高吸收峰，荧光密度(RFU)和底物浓度(nmol/L)的线性方程为：$y = 4.7741x + 128.04$，相关系数 $R^2 = 0.9901$，两者间相关性高。标准荧光底物在不同品系羧酸酯酶粗酶中均有较好的荧光吸收峰，并且荧光密度与底物浓度间均有较高的相关性，所得标准曲线符合实验要求(未列出)。

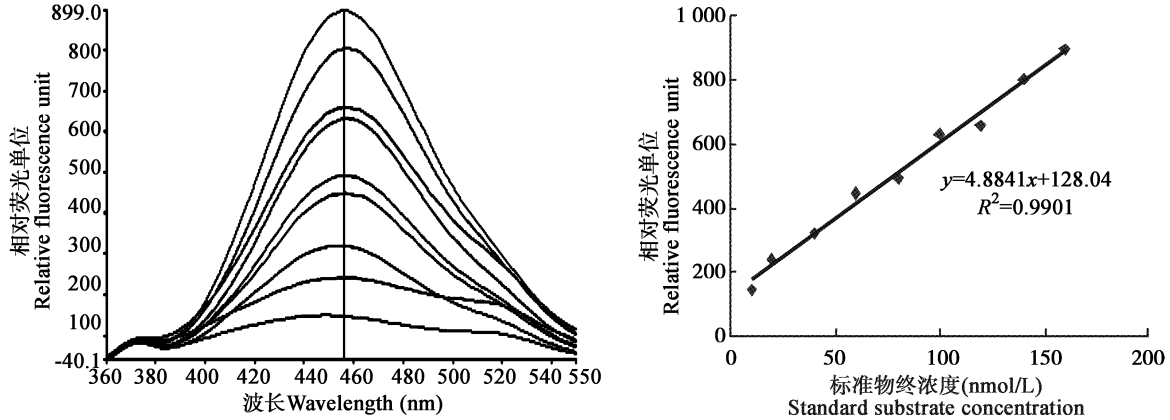


图 2 标准荧光底物 6-甲氧基-2-萘甲醛荧光密度(A)和标准曲线(B)

Fig. 2 Fluorescence density (A) and standard curve (B) of the standard substrate 6-methoxy-2-naphthaldehyde

2.2 羧酸酯酶对荧光底物的代谢活力

羧酸酯酶粗酶代谢高效氯氰菊酯和溴氰菊酯报告荧光底物结果如图 3 和表 1。从图 3 中可以看出：底物和酶液基线相对于标准底物和合成产物荧光密度均很小，说明底物和酶液荧光信号背景低，对底物水解产物干扰小；羧酸酯酶对合成荧光报告底物在波长 460 nm 处有一高的荧光吸收峰，满足测定的要求。

将不同棉蚜品系羧酸酯酶粗酶液按照上述体系得出标准曲线，然后根据标准底物标准曲线和各品系棉蚜羧酸酯酶代谢溴氰菊酯和高效氯氰菊酯荧光底物的荧光密度，求得羧酸酯酶代谢活力，结果见表 1。氧化乐果抗性和敏感品系羧酸酯酶对溴氰菊酯报告荧光底物代谢活性分别为 10.0 和 3.4 pmol/min · mg，抗性品系代谢活性为敏感的 2.9 倍；对于高效氯氰菊酯报告荧光底物，氧化乐果抗性和敏感品系羧酸酯酶代谢活性分别为 4.0 和 2.4 pmol/min · mg，抗性品系代谢活性为敏感品系的 1.7 倍。室内生物测定结果显示棉蚜对氧化乐果的抗性倍数为 21.72 倍(Cao *et al.*, 2008a)。氧化乐果抗性品系羧酸酯酶对溴氰菊酯和高效氯氰菊酯报告底物代谢均高于敏感品系，这可能是由于抗性品系中羧酸酯酶活性增加所导致的。

溴氰菊酯抗性和敏感品系羧酸酯酶对溴氰菊酯报告荧光底物的代谢活力分别为 7.6 和 6.2 pmol/min · mg，抗性品系羧酸酯酶代谢活性为敏感品系的 1.2 倍；对于高效氯氰菊酯报告底物，溴氰菊酯抗性和敏感品系羧酸酯酶代谢活性分别为 9.3 和 5.2 pmol/min · mg，抗性品系代谢活性为敏感品

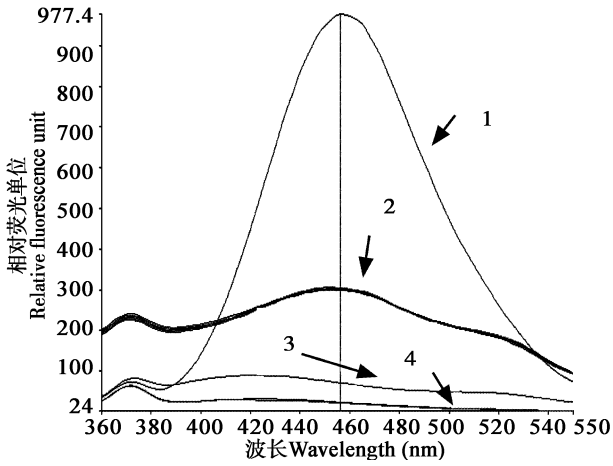


图 3 标准品、样品、合成底物和酶荧光密度曲线比较

Fig. 3 Comparison of fluorescence density curves of the standard substrate, sample, fluorescence substrate and enzyme

1：标准样品荧光曲线 Fluorescence density curve from the standard sample；2：样品荧光曲线 Fluorescence density curve from the sample；3：底物荧光曲线 Fluorescence density curve from the substrate；4：酶液荧光曲线 Fluorescence density curve from the enzyme.

系的1.8倍。室内生物测定结果显示棉蚜对溴氰菊酯抗性倍数为 228.59 倍(Cao *et al.*, 2008b)。溴氰菊酯抗性品系棉蚜羧酸酯酶代谢活性显著高于敏感品系，这说明了抗性品系羧酸酯酶活性高于敏感品系增加了对溴氰菊酯和高效氯氰菊酯的代谢能力，该结论提示了羧酸酯酶可能参与棉蚜对拟除虫菊酯抗性形成。

表 1　不同棉蚜品系羧酸酯酶对溴氰菊酯和高效氯氰菊酯报告底物的代谢活性

Table 1　Specific carboxylesterase activity to deltamethrin and cypermethrin fluorescent substrates in different cotton aphid, *Aphis gossypii* strains

底物 Substrate	羧酸酯酶代谢活性 Specific carboxylesterase activity (pmol/min · mg)					
	YRR	YSS	YRR/YSS	DRR	DSS	DRR/DSS
溴氰菊酯报告底物 Deltamethrin reporter substrate	10.0 ±0.7 A	3.4 ±0.2B	2.9	7.6 ±0.4 a	6.2 ±0.2 b	1.2
高效氯氰菊酯报告底物 Cypermethrin reporter substrate	4.0 ±0.2 A	2.4 ±0.1 B	1.7	9.3 ±0.9 a	5.2 ±0.4 b	1.8

YRR：氧化乐果抗性品系 Omethoate-selected resistant strain；YSS：氧化乐果敏感品系 Omethoate-selected susceptible strain；DRR：溴氰菊酯抗性品系 Deltamethrin-selected resistant strain；DSS：溴氰菊酯敏感品系 Deltamethrin-selected susceptible strain. 同一行数据后具有不同大写和小写字母分别表示同一药剂抗性品系与敏感品系之间差异极显著(Tukey, $P<0.01$)和显著(Tukey, $P<0.05$)。Means ± *SD* in the same line followed by different capital and small letters indicate extremely significant ($P<0.01$) and significant difference ($P<0.05$), respectively, between the susceptible and resistant strains to the same chemical by the Tukey's multiple comparison test.

3 讨论

酯酶是属于 α/β 水解酶系，能够代谢酯类物质的一类酶的总称，分布于昆虫各个组织中，具有广泛的多态性。已有报道酯酶的量变或质变增加对杀虫剂的代谢是其参与杀虫剂的抗药性的重要机制(Devonshire and Field, 1991；孙鲁娟等, 2002；郭惠琳和高希武, 2005)。目前，人们对酯酶代谢内源性和外源性农药和药物的研究越来越广泛，特别是羧酸酯酶对拟除虫菊酯、有机磷和氨基甲酸酯三大类农药的水解(Sogorb and Vilanova, 2002; Huang et al., 2005)。昆虫羧酸酯酶主要由 3 个氨基酸残基(Ser, His 和 Glu 或 Asp)组成催化活性中心(Bencharit *et al.*, 2003a, 2003b)。在许多组织中这些化合物的一种重要代谢途径是酯键连接处被酯酶断裂而形成酸和醇，醇进一步氧化成酸(Casida, 1983; Crawford *et al.*, 1981)。Ⅱ型菊酯的醇半族是氰醇，它具有不稳定性，能很快转化成醛(Shono *et al.*, 1979)。氰醇和母体酯比较，所形成的醛在光学特性上具有重要的不同，表现为在长波长上有强的吸收。这种方法避免了放射示踪、GC 和 HPLC 方法慢、昂贵而且是点测定而不是连续测定的缺点。通过利用这些物理特性和包括具有能够产生荧光或色度特性的芳香族，研究者可以设计一个低荧光背景的含有 α-氰基的酯酶底物。运用这个方案，我们成功设计合成了高效氯氰菊酯和溴氰菊酯类似底物。

Shan 和 Hammock(2001)运用菊酯敏感和抗性烟青虫的酶匀浆液对两个合成底物(R, S)-乙酸氰基-(6-甲氧基萘-2-基)-甲酯(命名为化合物Ⅰ)和(R/S)3-(2,2 二氯(溴)乙烯基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸氰基-(6-甲氧基萘-2-基)-甲酯(命名为化合物Ⅱ)代谢能力进行实验，结果表明：粗酶对化合物Ⅰ和Ⅱ均有较高的代谢活性，并且菊酯选育的抗性烟青虫酯酶对化合物Ⅰ和Ⅱ代谢活性比敏感品系高；抗性品系对于化合物Ⅰ代谢活性比敏感品系高 1.5 倍。用 α-乙酸萘酯作为底物进行平行实验结果显示出类似的结果(抗性为敏感品系的 1.4 倍)；然而，当用化合物Ⅱ测试时，抗性品系显示出比敏感高出 5 倍的活性。这些研究结果表明评价菊酯特殊酯酶活性与昆虫抗药性有相关性。因此，化合物Ⅱ或者相关的菊酯衍生底物对于监测昆虫的抗性机制是非常有用的。

总之，通过合成荧光酯酶报告化合物来检测解

毒酶对杀虫剂代谢能力，这种策略具有灵敏、高效的优点。这些 α-氰基底物拥有非常低的背景并且比酚类底物更加稳定。但是，酯酶对菊酯报告底物的水解受 pH 值、底物的稳定性以及酶特性(例如酶纯度、颜色等)的影响，因此运用该策略时对这些影响因素的优化是必要的。有关温度、pH、酶纯度以及底物浓度等因素对羧酸酯酶代谢活性的影响还有待进一步的研究。另外，相同的研究策略还可以进一步对其他酶[例如 P450、环氧水解酶、乙酰胆碱酯酶、葡(萄)糖苷酶、葡(萄)糖苷酸酶和碱性磷酸(酯)酶]代谢能力的研究。

参 考 文 献 (References)

Bencharit S, Morton CL, Hyatt JL, Kuhn P, Danks MK, Potter PM, Redinbo MR, 2003a. Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer′s drug tacrine: From binding promiscuity to selective inhibition. *Chem. Biol.*, 10 (4): 341 – 349.

Bencharit S, Morton CL, Xue Y, Potter PM, Redinbo MR, 2003b. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nat. Struct. Biol.*, 10 (5): 349 – 356.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Cao CW, Zhang J, Gao XW, Liang P, Guo HL, 2008a. Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 90: 175 – 180.

Cao CW, Zhang J, Gao XW, Liang P, Guo HL, 2008b. Differential mRNA expression levels and gene sequences of carboxylesterase in both deltamethrin resistant and susceptible strains of the cotton aphids, *Aphis gossypii*. *Insect Sci.*, 15: 209 – 216.

Casida JE, 1983. Novel aspects of metabolism of pyrethroids. In: Miyamoto J, Kearney PC eds. Pesticide Chemistry: Human Welfare and The Environment. Pergamon, New York. 187 – 192.

Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH, 1981. The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats: Excreted metabolites. *Pestic. Sci.*, 12: 393 – 411.

Devonshire AL, Field LM, 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.*, 36: 1 – 23.

Funaki E, Deuterman WC, Motoyama N, 1994. *In vitro* and *in vivo* metabolism of fenvalerate in pyrethroid-resistant houseflies. *J. Pestic. Sci.*, 19: 43 – 52.

Gassman PG, Tally JJ, 1978. Cyanohydrins: General synthesis. *Tetrahed. Lett.*, 40: 3 773 – 3 776.

Guo HL, Gao XW, 2005. The mutation of carboxylesterase gene of cotton aphid, *Aphis gossypii* associated with omethoate resistance. *Acta Entomologica Sinica*, 48 (2): 194 – 202. [郭惠琳, 高希武, 2005. 棉蚜抗氧化乐果品系的羧酸酯酶基因突变. 昆虫学报, 48 (2): 194 – 202]

Gutfreund H, Sturtevant JM, 1956. The mechanism of the reaction of chymotrypsin with *p*-nitrophenyl acetate. *Biochem. J.*, 63: 656 – 661.

Hougard JM, Duchon S, Zaim M, Guillet P, 2002. Bifenthrin: a useful pyrethroid insecticide for treatment of mosquito nets. *J. Med. Entomol.*, 39: 526 – 533.

Huang H, Stok JE, Stoutamire DW, Gee SJ, Hammock BD, 2005. Development of optically pure pyrethroid-like fluorescent substrates for carboxylesterases. *Chem. Res. Toxicol.*, 18 (3): 516 – 527.

Shan G, Hammock BD, 2001. Development of sensitive esterase assays based on alpha-cyano-containing esters. *Anal. Biochem.*, 299 (1): 54 – 62.

Shan G, Ottea JA, 1998. Metabolism fate of cypermethrin in pyrethroid-susceptible and -resistant tobacco budworm. In: Proc. Beltwide Cotton Conf. 1 102 – 1 105.

Shono T, Ohsawa K, Casida JE, 1979. Metabolism of *trans*- and *cis*-permethrin, *trans*- and *cis*-cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (2): 316 – 325.

Sogorb MA, Vilanova E, 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.*, 128 (1 – 3): 215 – 228.

Sun LJ, Gao XW, Zheng BZ, 2002. Characteristics of carboxylesterase in omethoate-resistant and susceptible strains of cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 724 – 727. [孙鲁娟, 高希武, 郑炳宗, 2002. 棉蚜抗氧化乐果品系及敏感品系羧酸酯酶性质的比较. 昆虫学报, 45(6): 724 – 727]

(责任编辑:赵利辉)